

## (54) PREPARATION OF UNIFC HBsAg PARTICLES

(11) Kokai No. 53-104724 (43) 9.12.1978 (19) JP  
 (21) Appl. No. 52-18938 (22) 2.23.1977  
 (71) MIDORI JUJI K.K. (72) HIROYUKI SHIRAISHI(2)  
 (52) JPC: 30D1;30D3;113E6  
 (51) Int. Cl<sup>2</sup>. A61K39/12, G01N33/16

**PURPOSE:** To prepare HBsAg particles having high antigenicity, low side effects, and free from infectivity, useful as a raw material of serum-hepatitis vaccine, and standard antigen reagent, by heating HBsAg existing in human blood-plasma in the presence of a nonionic surface active agent and a protein-denaturing agent.

**CONSTITUTION:** Globular HBsAg particles having an isoelectric point of pH5.5–6.5, a molecular weight of 2–4 millions, specific gravity of 1.24–1.80, and diameter range of 180–200Å, are obtained by the heat treatment of a surface antigen of hepatitis virus B (HBsAg) in the presence of 0.1–2.0%W/V of a nonionic surface active agent, selected from polyoxyethylene (7–10) alkylphenol and polyoxyethylene (20) sorbitan monoalkylester, and a protein-denaturing agent such as urea (pref. 4–6M) or guanidine (pref. 2–4M), and if necessary, a reducing agent such as 2-mercaptoethanol, at 30–50°C, pref. 35–40°C, for 5–120 min., pref. 20–50 min.

## (54) STAINPROOFING AGENTS IN WATER

(11) Kokai No. 53-104729 (43) 9.12.1978 (19) JP  
 (21) Appl. No. 52-18055 (22) 2.23.1977  
 (71) SHOWA DENKO K.K. (72) TAKASHI MINOURA(2)  
 (52) JPC: 30F371.11;30F91;30F93;13(9)B94  
 (51) Int. Cl<sup>2</sup>. A01N9/20, C09K3/00

**PURPOSE:** To prepare stainproofing agents in water, which prevent to adhere sea lifes to vessels, fishing nets, submarine construction, etc., without environmental pollution, from amino acids, amino acid esters, etc., as active constituents.

**CONSTITUTION:** Stainproofing agents are prep'd. from amino acids (e.g., glycine), amino acid 1–5C alkylesters, or their salts (e.g. glycine ethylester sulfate), etc., as active constituents. They are applied by adding  $\geq 0.05$  ppm, pref. 0.05 ~ 10 ppm of them to sea directly, or 5 ~ 50 wt.% of them to compositions such as paints.

## (54) CONTROL FOR WEEDS IN BEAN CULTURE

(11) Kokai No. 53-104730 (43) 9.12.1978 (19) JP  
 (21) Appl. No. 52-17445 (22) 2.18.1977  
 (71) KUMIAI KAGAKU KOGYO K.K.  
 (72) KAZUO NAOHARA(3)  
 (52) JPC: 30F371.217.3;30F932  
 (51) Int. Cl<sup>2</sup>. A01N9/20

**PURPOSE:** To control weeds with no phytotoxicity by foliar treatment of beans at the growing period with specific urea type herbicides.

**CONSTITUTION:** Weeds in bean culture are controlled by foliar treatment with herbicides contg. N-(4-phenoxyphenyl)-N'-methylurea as an active constituent. The concn. for their application is 50–30,000 ppm, pref. 500–5000 ppm.

⑩日本国特許庁  
公開特許公報

⑪特許出願公開  
昭53-104724

⑤Int. Cl.<sup>2</sup>  
A 61 K 39/12  
G 01 N 33/16

識別記号

⑥日本分類  
30 D 1  
30 D 3  
113 E 6

厅内整理番号  
7432-44  
6667-44  
6904-49

⑦公開 昭和53年(1978)9月12日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑧均一なHBsAg粒子の製造方法

⑨発明者 白地良一

名取市名取ガ丘2丁目12番10号

⑩特 願 昭52-18938

同 石田名香雄

⑪出 願 昭52(1977)2月23日

仙台市角五郎一丁目5の40

特許法第30条第1項適用 昭和51年10月28日  
～30日第24回日本ウイルス学会総会において  
発表

⑫出願人 株式会社ミドリ十字

大阪市城東区中央1丁目1番47  
号

⑬発明者 白石広行

⑭代理人 弁理士 浅村皓

外3名

仙台市米ヶ袋2丁目2-5

明細書

1. 発明の名称

均一なHBsAg粒子の製造方法

2. 特許請求の範囲

⑮ HBsAgを、オキシエチレンを分子中に平均7  
～10モル含有するポリオキシエチレンアルキル  
フェノール及びオキシエチレンを分子中に平均約  
2.0モル含むポリオキシエチレンモノアルキルエ  
ステルから選ばれた非イオン界面活性剤と尿素、  
グアニジンから選ばれたタンパク変性剤を存在さ  
せ、更に還元剤を存在させあるいは存在させずに、  
加熱処理し、均一な変性HBsAg粒子を分取するこ  
とを特徴とする等電点pH 5.5～6.5、分子量2～  
4百万、比重1.24～1.80、直径180～200Åの球形  
粒子の高い抗原性を保持する均一な変性  
HBsAg粒子の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はヒトの血漿中のHBsAg (Hepatitis B  
surface antigen)から非イオン界面活性剤、タ  
ンパク変性剤の存在下で加熱処理することによつ

て高い抗原性を保持した、等電点pH 5.5～6.5、  
分子量2～4百万、比重1.80～1.24、直径  
180～220Åの球形粒子の均一な変性HBsAg  
粒子の製造方法に関する。

⑯ B型肝炎ウイルス(HBV)はヒトの血清肝炎を  
起すウイルスとして知られ、輸血を要する患者や  
臨床検査、血漿製剤に従事する者にしばしば感染  
し、誠にやつかいな問題を引き起す。今日HBV  
はコア抗原(HBcAg)と表面抗原(HBsAg)及び  
e抗原とから成り立ちコアの中にDNAポリメラ  
ーゼを持つ直径約40nmの大型粒子であることが  
知られており[WHO Technical Report Series No. 570、viral hepatitis 1975]、又アンチ-HBs  
(Anti-HBs)がこのHBVの感染を予防し得  
ることも既に明らかにされている。  
⑰ 又は血漿画分を密度勾配超遠心分離法によつて、  
従来HBsAgは、これを含む血漿度1.20～1.25  
の分画を得る方法[J.L. Gerin、P.V. Holland  
及びR.H. Pascall (J.L. Gerin, P.V. Holland

and R.H. Purcell) : ジャーナル オブ ベイロロジー (Journal of Virology) 第 7 卷、第 569-576 ページ (1971 年) 及び N. スケノ、R. シラチ、J. ヤマグチ及び N. イシダ (N. Sukeno, R. Shirachi, J. Yamaguchi and N. Ishida) : 同誌、第 9 卷、第 182-183 ページ (1972 年) ] によつて比較的純粹に得られていた。

更に新しくはアフィニティーコロマトグラフィー法が提案されている (白石広行、石田名香雄、助野典義 : 日本ウイルス学会抄録昭和 48 年 1 月 4、5、6 日発表、東京において)。この方法の概要は次の通りである。

精製 HBsAg を動物、例えば山羊に免疫して得た山羊抗 HBs 血清に HBsAg を含まないヒトの血清を加えて混在するヒト血清成分に対する抗体を吸収沈殿させ、上清を硫酸アンモニウム沈殿分画法によつてアーグロプリン抗 HBs (anti-HBs) を得る。臭化シアンで活性化したセファロース-4B (Sephadex - 4B) とこの anti-HBs とをカップ

リングさせ、この生成物のカラムを準備する。HBsAg を含むヒト血清、又はこれから常法によつて分画された  $\alpha$ - 及び  $\beta$ -グロブリン画分を 0.01 M リン酸緩衝液に懸滴し、遠心分離し、得られる上清について上記のカラムを用いてクロマトグラフィーを行う。カラムに結合した HBsAg を 0.4 M -グリシン - HCl (pH 2.5) 緩衝液で溶出し、溶出液を 0.01 M リン酸緩衝液に対して透析し、HBsAg 溶液を得る。この溶液を、前記のカラムと同様に、但し、山羊抗 HBs 血清を用いる代りに、動物、例えば馬に免疫して得た抗馬ヒト血清血清を用いる以外は同様に調製したカラムを用いてクロマトグラフィーにかけ、微量に混在する血清成分をカラムにとどめ精製 HBsAg 溶液を通過部分として集める。

HBsAg を構成するサブユニットについては、HBsAg を切断することによつて見い出されるペプチドを検索し、サブユニットは種々の分子量のポリペプチドを含むことが多くの報告者によつて報告されている。なわち、グリン (前出) は HBsAg

は、分子量 26,000、32,000 及び 40,000 のポリペプチドからなることを報告している。その外、それが、25,000 及び 32,000 の分子量のポリペプチド [G.N. ビヤス、E.W. ウィリアムス、GGB クラウス及び H.E. ボンド (G.N. Vyas, E.W. Williams, GGB Klaus and H.E. Bond) : ザ ジャーナル オブ イムノロジー (The Journal of Immunology) 第 108 卷、第 1114-1118 ページ (1972 年) ]、39,000、32,000、27,000 及び 22,000 のポリペプチド並びに微量の 16,000 及び 10,000 のもの [G.R. ドレスマン、F.B. ホーリンガー、J.K. スリアノ、R.S. フジオカ、J.P. ブルンシュヴィヒ及び J.L. メルニク (G.R. Dresman, F.B. Hollinger, J.P. Suriano, R.S. Fujioka, J.P. Brunschwig and J.L. Melnik) : ジャーナル オブ ベイロロジー、第 10 卷、第 469-476 ページ (1972 年) ] 及び分子量 100,000 のポリペプチドを主成分とし、65,000、36,000 及び 20,000 のもの [C.R. ハワード及び A.J. ツッカーマン

(C.R. Howard and A.J. Tuckerman) : ヘパタイテイス メモランダ (Hepatitis Memoranda)、H-576、1973 年 10 月、U.S.A.] のサブユニットから構成されることが報告されている。又 N. スケノ、S. アイカワ及び N. イシダ (N. Sukeno, S. Aikawa and N. Ishida) : 同誌、H-292、1972 年 4 月、U.S.A.] は、HBsAg を尿素の存在においてドテシル硫酸ナトリウムによつて切断するドテシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動簡易分子量分析法 [コロウイック - カプラン (Colowick - Kaplan) : メソード イン エンチモロジー (Method in Enzymology) 第 26 卷、第 3 ページ (1972 年) ] によつてそれが分子量 25,000、28,000 及び 33,000 のポリペプチドのサブユニットからなることを報告している。

このような HBsAg のサブユニットの探索は、そのサブユニットと抗原性の関係を明らかにし、より抗原性の特異部位を取り出すことを目的としており、ひいては効率的なワクチン、試験の原料と

しての利用、HBsAg の抗原基の研究への利用を図ろうとするものである。

本発明の共同研究者等も先に、この HBsAg の抗原性をもつサブユニットの回収法として、HBsAg を脱リピド化 (delipidation) することのできるある種の界面活性剤の存在下で加熱処理することによって、HBsAg としての抗原性を保持した分子量約 5,500,000 の単一のポリペプチドのみのサブユニットからなる大きさが約 18 - 20 nm の均一な球形粒子 (HBsAg<sub>55</sub>) に変換することができるなどを示している (特開昭 50-160420)。

本発明は、このような事実を背景としてなされたものであり、HBsAg の抗原性を持つ粒子の回収法として新たな方法を発明し、その方法によつて新規性状を有する、すなわら等電点 pH 5.5 - 6.5、分子量 2 - 4 百万、比重 1.80 ~ 1.24、直徑 180 ~ 220 Å の球形粒子の高い抗原性を保持した均一な変性 HBsAg<sub>55</sub> を提供することに成功したのである。

本発明は HBsAg をオキシエチレンを分子中に平

特開昭53-104724 (3)  
均 7 ~ 10 モル含有するポリオキシエチレンアルキルエノール及びオキシエチレンを分子中に平均約 20 モル含むポリオキシエチレンモノアルキルエスチルから選ばれた非イオン界面活性剤と尿素、グアニジンから選ばれたタンパク変性剤の存在において加熱処理し、均一な変性 HBsAg 粒子の抗原性画分を分取することを特徴とする等電点 pH 5.5 ~ 6.5、分子量 2 - 4 百万、比重 1.80 - 1.24、直徑 180 ~ 220 Å の球形粒子を有する高い抗原性を保持する均一な変性 HBsAg 粒子の製造方法である。

本発明において用いられる HBsAg は前述の公知の方法によつて血漿又は血清から比較的純粋に得られるが、α- 及び β- グロブリンを含む血漿画分、例えばコーンのアルコール分画法における N-1 画分は原料として最も好ましい。かくして得られた HBsAg はそのまま、好ましくは更に精製して本発明に用いられる。

すなわち、前記の公知の方法で得られた HBsAg はセファデックス G-200 (スウェーデン、フア

ーマシア社製市販) のようなデキストランゲル、バイオゲル P-300 (バイオーランド社製市販品) のようなポリアクリルアミドゲル、又はセファロース 6-B のようなアガロースゲルである分子量約 3,000 ないし 15,000 の物質を対象として分子篩クロマトグラフィーに用いられる親水ゲルを通して、分子量の小さい夾雜物を除去することができる。夾雜物の除去は HBsAg の塩化ナトリウム等強緩衝溶液 (pH 6 - 8) を同じ緩衝液で平衡化した上記のゲルカラムを通過させて行うことができる。

本発明に用いられる界面活性剤は、オキシエチレンを分子中に平均 7 ~ 10 モルを有するポリオキシエチレンアルキルエノール型の界面活性剤、例えばポリオキシエチレン (9)、オクチルエノール、及びオキシエチレンを分子中に平均 20 mol 含むポリオキシエチレンソルビタンモノアルキルエスチル型の界面活性剤、例えばポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレートなどから選ばれる非イオン界面活性剤である。

界面活性剤の添加量は 0.1 ~ 2.0 % w/v、好ましくは、0.25 - 1 % w/v である。

本発明で用いられるタンパク変性剤は尿素、グアニジン等である。その添加濃度は、尿素では 2 ~ 8 M、好ましくは 4 ~ 6 M であり、グアニジンでは 1 ~ 6 M、好ましくは 2 ~ 4 M である。

加温は緩衝液で pH 中性に保持された水溶液中で行われ、温度は 30 ~ 50 °C、好ましくは 35 ~ 40 °C で、反応時間は 5 ~ 120 分間、好ましくは 20 ~ 50 分間処理される。

この処理によつて生成する変性 HBsAg 粒子は等電点分画法 [スベンソン、H: アクタケミカルスカンジナビカ (Svensson, H: Acta Chem. Scand.) 15, 325 (1961), 16, 456 (1962).] に従つて分画すると等電点 3.0 - 4.0、5.0 - 5.5、5.5 - 6.5 を示す 3 成分として確認され二次元拡散法 [イムノケミストリー (Immunochemistry) 2, 235 (1965)], ラジオイムノアッセイ法 [最新医学、27, 1233 (1972)] によつて HBsAg の抗原性を分析す

るとpH 5.5～6.5の画分にその抗原性が集約されている故、この画分を分取する。

この処理に加えて、2-メルカプトエタノール、ジテオスレイトール等の還元剤を加温処理反応液に添加することは、別の興味ある結果を導いた。すなわち2-メルカプトエタノール等の還元剤を0.5～1.5%W/V、好ましくは0.75～1.25%W/Vの量でタンパク変性剤及び非イオン界面活性剤に加えて加温処理反応液に添加すると、HBsAgの変性化が促進されることを示唆する結果を得た。この処理によつた場合も等電点分画法による各成分の等電点はpH 3.0～4.0、5.0～5.5、5.5～6.5を示し、抗原性を保持するのは、pH 5.5～6.5の画分に存在する。

この場合、この等電点pH 5.5～6.5の変性HBsAgの抗原性は還元剤の存在下では非常に低下し、還元剤を除去することによつて回復する。

等電点pH 5.5～6.5の変性HBsAgの回収は等電点分画法によつてpH 5.5～6.5の画分を集め、公知の方法に従つて、例えば十分量のリン酸緩衝液

本発明による均一な変性HBsAgは高度に精製され、抗原性の高い粒子であるので、感染性のない、副作用の少ない効率的なコンポーネントワクチンの材料として用いることができる。

又HBsAgの抗原基その他の性状を研究のために、このHBsAgを構成しているサブユニットから酵素処理などの方法によつて、切断してペプチドを得る〔例えばステワード、J.M. ヤング J.D. 及びベンジャミン I.E. (Steward, J.M., Young, J.D. and Benjamin, I.E.): バイオケミストリ (Biochemistry) 第5巻、第3396ページ、1966年〕目的の原料として好適である。

更には、その高度な純度と抗原性からHBVの抗原性の測定上標準抗原試薬として用いるのに適していることは言うまでもなく、又一定の抗体活性を有する抗体を得るための免疫材料として好適に用いられる。

本発明を更に具体的に説明するために以下実施例を掲げるが、実施例の記載は本発明を何ら限定するものではない。

特開昭53-104724(4)に対して透析し、遠心分画法等によつて濃縮し、更にゲル通過を行うことによつて、タンパク変性剤、界面活性剤、還元剤を除去することによつて水溶液として得ることができる。

このようにして得られた均一な変性HBsAg粒子は高い抗原性を有し、等電点は、pH 5.5～6.5を有し、密度勾配超遠心分析法〔ジャーナル オブバイロロジー、21, 569 (1971)〕による比重は、1.80～1.24、電子顕微鏡所見による粒子直径〔ネーチュア (Nature)、218, 1057 (1968)〕は、直径180～220Åの球形粒子で、これらからその分子量を推定すると〔ヘパティテイス メモランダ (Hepatitis Memoranda) H-17日、(1971)、USA〕200万～400万である。又その構成サブユニットは、アクリルアミドゲル電気泳動簡易分子量分析法〔メソード イン エンチモロジー (Method in Enzymology)、26, 3 (1972)〕によると、分子量55,000、32,000、27,000のものから成り立つていた。

#### 実施例1

HBsAg陽性と判定されたプール血漿1lを用い超遠心分離法によつて精製して得た精製HBsAgを原料として用いた。精製HBsAgの抗原価は逆受身赤血球凝集反応 (RPHA) 法 [G.N. ビヤス (G.N. Vyas) ら、ザジャーナル オブ イムノロジー 第100巻 (2)、第294ページ (1968年)]によつて測定して1:320,000であつた。この精製HBsAgは、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動簡易分子量分析法 (前出)によつて分子量が25,000、28,000及び33,000のポリペプチドのサブユニットからなることが認められた。このHBsAgの0.15M濃度の塩化ナトリウムで等張としたpH 7.5、0.01Mトリス-塩酸緩衝溶液5mlを同一緩衝溶液で平衡としたセファデックスG-200の2.5cm×4.5cmのカラムを用いてゲル通過して、最初に流出して来たHBsAg分画1.7mlを集め、後で流出する夾雑物溶液と分離した。このHBsAg溶液を同一緩衝溶液に対して減圧透析して濃縮し、6mlとし

抗原価は R P H A 法によつて 1 : 1,280,000

であつた。回収率は 65% であつた。

#### 実施例 2

た後、これに最終濃度 0.5% となるようにポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート (P E S) 及び 4M 量の尿素を加え、37°C で 30 分間加熱処理を施した。処理を終つた後は 0.15M 塩化ナトリウムで等強化した 0.1% の P E S を含む pH 8.0 の 0.01M トリス塩酸緩衝液で平衡させたセファアデックス G - 200 の 2.5 × 4.5cm のカラムを用いてゲル通過した。分離されてきた変性 HBsAg 粒子から抗原性を有した画分を集め、塩化ナトリウムで等強とした pH 7.5 の 0.01M トリス塩酸緩衝液で平衡としたセファアデックス G - 50 の 1.5 × 6.0cm のカラムを用いてゲル通過して尿素及び P E S を除去した。このようにして得られた均一な変性 HBsAg 粒子の水性懸濁液を減圧透析することによつて濃縮して 2ml とし、HBsAg の抗原性を保持する変性 HBsAg の濃縮溶液を得た。

このものは、等電点 pH 5.5 - 6.5 であり、分子量 2 ~ 4 百万で、分子量 55,000, 32,000, 27,000 のサブユニットから構成されており、

HBsAg 陽性のパール血清 10ml を用い、アフィニティークロマトグラフィー法で精製して得た抗原価 1 : 320,000 (R P H A 法) <sup>精</sup> 製 HBsAg を 1% 加入して用いた。この精製 HBsAg は SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動簡易分析法によつて、分子量が 17,000, 25,000, 28,000, 33,000, 40,000, 52,000 および 60,000 の 7 種のポリペプタイドのサブユニットが認められた。精製 HBsAg の 0.15M 塩化ナトリウムで等強とした pH 7.2, 0.05M リン酸緩衝液 3.0ml を、同一緩衝液で平衡としたペイオゲル P - 300 の 5 × 9.0cm のカラムを用いてゲル通過し、最初に流出して来た HBsAg 画分 1.5ml を分取した。この溶液を同一緩衝液に対し減圧透析して、濃縮し、1.0ml とした後、1% となるようにポリオキシエチレン (9) オクチルフェノール及び 4M 量の尿素を加え、45°C で 20 分間加

熱処理を施した。

処理を終えた後は 1% TW - 80 (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート)、6M urea 中 37°C 30 分処理後、アンホライント 2.5 - 8 範囲で 0.1% TW - 80, 6M urea 中、常法に従つて 4°C で、等電点分画を行い、pH 5.5 ~ 6.5 の等電点を有する画分を回収した。この画分を 0.15M 塩化ナトリウム溶液に対して減圧透析してポリオキシエチレン (9) オクチルフェノール及び尿素を除去するとともに濃縮して 1.0ml の変性 HBsAg 粒子を含む溶液を得た。このものは等電点 pH 5.5 - 6.5 (等電点ピーク 6.0) であり、分子量 2 ~ 4 百万で分子量 55,000, 32,000, 27,000 のサブユニットから構成されており、抗原価は 1 : 1,280,000 (R P H A 法) で、回収率は 70% であつた。

#### 実施例 3

実施例 1 を繰り返した。但し、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート (P E S) 0.5% 濃度及び尿素 4M 量に加えて、1% 濃度に

2 - メルカプトエタノールを添加して 40°C、30 分の加温処理を用いた。

このものは、等電点 pH 5.5 - 6.5 であり、分子量 2 ~ 4 百万で、分子量 55,000, 32,000, 27,000 のサブユニットから構成されており、回収率は 1 ~ 5% であつた。

未処理の HBsAg 並びに実施例 2 及び 3 の場合の等電点分画像をそれぞれ第 1 ないし第 3 図に示す。

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 ~ 3 図は未処理 HBsAg 並びに実施例 2 及び 3 において処理した場合の等電点分画図である。

第 1 図は未処理の場合、

第 2 図は実施例 2 の処理の場合、

第 3 図は実施例 3 の処理の場合、

をそれぞれ示す。

なお図中の斜線面積は抗原性活性面分を示す。

代理人 滝 村 皓

外 3 名

図 1

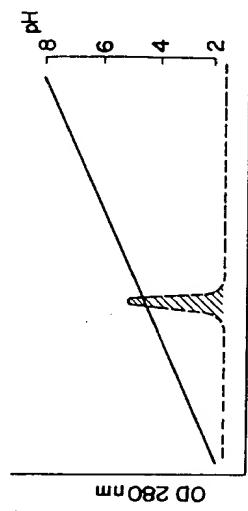


図 2

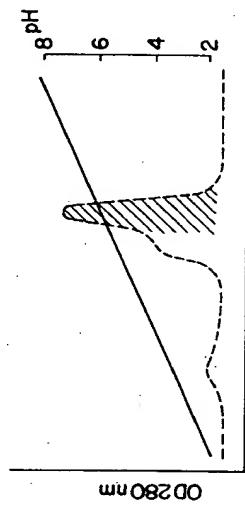


図 3

